

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

KLASSIFIZIERUNG VON PARAPOCKENVIREN MITTELS KARTIERUNG VON RESTRIKTIONSENZYM-SCHNITTSTELLEN UND HYBRIDISATIONEN AUF DER VIRUS DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Urs Gassmann
Tierarzt
von Sempach /LU

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. R. Wittek, Korreferent

Archiv-Druckerei AG, Zürich
Zürich 1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

KLASSIFIZIERUNG VON PARAPOCKENVIREN
MITTELS KARTIERUNG VON RESTRIKTIONSENZYM-SCHNITTSTELLEN
UND HYBRIDISATIONEN AUF DER VIRUS DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Urs Gassmann
Tierarzt
von Sempach/LU

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. R. Wittek, Korreferent

Archiv-Druckerei AG, Zürich
Zürich 1983

Abkürzungen

Ak	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
ATV	Alkalische Trypsin-Versenlösung
eBLC	Embryonic Bovine Lung Cell
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
Ci	Curie
cpm	Counts per minute
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
E'MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FCS	Fetal Calf Serum
GC	Guanin Cytosin
dGTP	Desoxy-Guanidintriphosphat
IE	Internationale Einheit
MOI	Multiplicity of Infection
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
rpm	Revolutions per minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Sodium Chloride-Sodium Citrate
TCA	Trichlorazetat
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectiv Dosis 50%
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
ZPE	Zytopathischer Effekt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Parapockenviren	1
1.2. Krankheiten verursacht durch die Parapockenviren	1
1.3. Parapockenviren als identische oder differenzierbare Erreger verschiedener Krankheiten	4
2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT	7
3. MATERIAL UND METHODEN	9
3.1. Parapockenvirusisolate	9
3.2. Zellkulturen	9
3.3. Virusvermehrung und Plaquereinigung	10
3.4. Virusreinigung	11
3.5. DNA Extraktion	13
3.6. DNA Restriktion	13
3.7. Agarose Gelelektrophorese	14
3.8. Reinigung und Isolation von DNA Fragmenten	15
3.9. Bestimmung der Endfragmente	16
3.10. Radioaktive Markierung	16
3.11. Transfer von DNA Fragmenten	17
3.12. Hybridisation	18
3.13. DNA-Längenstandard	18
4. RESULTATE	19
4.1. Restriktionsanalyse	19
4.2. Erstellung von Restriktionskarten	27
4.3. Eco RI und Hind III Restriktionskarten für die DNA von 12 Parapockenviren	28
4.4. Hybridisationsergebnisse	32
4.5. Kreuzhybridisationen der Endbereiche	46

	Seite
5. DISKUSSION	51
6. ZUSAMMENFASSUNG	57
7. LITERATURVERZEICHNIS	58

1. EINLEITUNG

1.1. Die Parapockenviren

Unter dem Genus Parapoxvirus innerhalb der Familie Poxviridae ordnet man eine Gruppe von Viren ein, die beim Rind an den Papillen der Stoma, sowie an Euter und Zitzen, bei Schaf und Ziege vorwiegend an den Lippen, pockenartige Läsionen verursachen. Lange Zeit war nicht klar, um welche Art von Erregern es sich handelte, und wo sie einzuordnen seien. Diese Unsicherheit widerspiegelte sich denn auch in der Vielfalt der Nomenklatur. Das Wort Parapockenvirus entwickelte sich historisch aus dem von Pirquet 1915 (24) geschaffenen Begriff der Paravaccine. Zu jener Zeit stellte man die Pockenvakzine noch aus von Kälbern gewonnener Lymphe her. Bisweilen kam es zu anormalen Impfreaktionen. Als Ursache dafür machte Pirquet einen Parasiten verantwortlich und nannte ihn Paravaccine. Heute glaubt man, dass Euterpockenviren für diese Reaktion verantwortlich waren. Parapockenviren sind in Abb. 1 dargestellt.

1.2. Krankheiten verursacht durch die Parapockenviren

Die von Parapockenviren verursachten Erkrankungen lassen sich kurz wie folgt beschreiben (2):

- a) Stomatitis papulosa des Rindes (engl.: Bovine papular stomatitis): Gutartige Stomatitis der kutanen Schleimhäute, proliferative Erosionen und Ulcera an den Papillen, bei normalem Verlauf keine oder nur geringe Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens.
- b) Euterpocken des Rindes: (Pseudo-, Wind-, falsche Kuhpocken, Paravakzine, Melkerknoten; engl. Pseudo Cowpox, False Cowpox, Spurious Cowpox, Milker's Nodules).

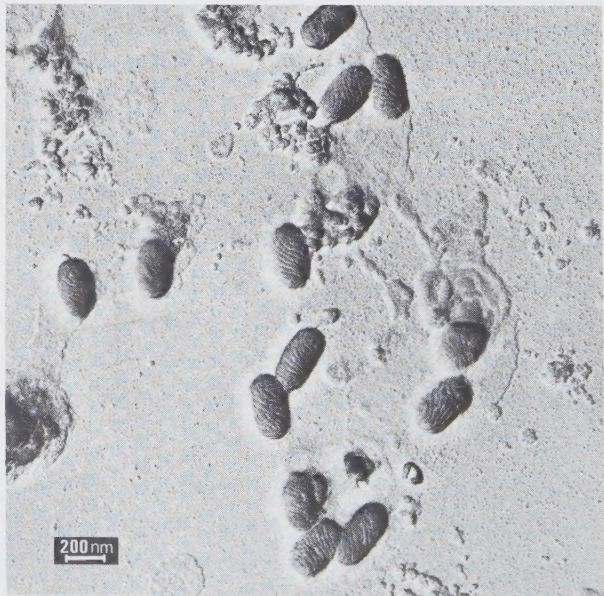


Abb. 1:

Elektronenmikroskopische Aufnahme von platinbedampften Parapockenviren des Stammes R 1781.

An der Oberfläche des längsovalen Viruspartikels mit Kokonform befinden sich spiralgewundene Proteinröhrchen. Die Grösse des Kokons beträgt ca. 160 x 280 nm. Das Virion ist also deutlich kleiner als die Orthopockenviruspartikel, welche ca. 170 - 250 x 300 - 325 nm messen und ein quaderförmiges Aussehen haben.

Aufnahme: Dr. P. Wild, Labor für Elektronenmikroskopie der Vet.med. Fakultät



Oedeme oder Erytheme an Zitzen oder Euter, gefolgt von Exsudat- und Papelbildung. Das Exsudat trocknet ein, und nach dem Abfallen der Kruste bleiben keine Narben zurück.

- c) Pustulardermatitis der Schafe: (Ecthyma contagiosum, Lippengrind, Orf, Dermatitis pustulosa; engl.: Contagious pustular dermatitis, Sore mouth).

Beim Schaf beobachtet man meist nur eine Erkrankung der Lippen, obwohl auch eine podale und genitale Form bekannt sind, die unabhängig voneinander oder gekoppelt vorkommen können.

Labiale Form: Bildung von Knötchen, Bläschen und Pusteln am Lippenrand und in den Mundwinkeln. Nach dem Platzen der Bläschen entstehen Exsudatkrusten- und Borken, die mit der Ausheilung nach ca. 2 Wochen abfallen. Diese Läsionen stellen nur eine Behinderung bei der Futteraufnahme dar. Gravierendere Störungen treten erst bei Komplikationen auf.

Podale Form: Ähnliche Läsionen wie bei der labialen Form am Kronsaum und im Zwischenklauenspalt.

Genitale Form: Ähnliche Läsionen wie bei der labialen Form an Euter, Schenkelinnenseiten, Schamlippen oder am Präputium.

Nach einer natürlichen Parapockenvirus-Infektion sind keine oder nur niedrige neutralisierende Antikörpertiter im Serum feststellbar (7).

Parapockenvirus-Infektionen beim Tier können auf den Menschen übertragen werden, sind also Zoonosen.

Für die drei durch Parapockenviren verursachten Krankheitsbilder und für die entsprechenden Erreger werden in der Folge die Ausdrücke Stomatitis papulosa, Euterpocken und Pustulardermatitis verwendet.

1.3. Parapockenviren als identische oder differenzierbare Erreger verschiedener Krankheiten

Die Frage, ob Parapockenviren identische Erreger mit verschiedener vom Wirt abhängiger Spezifität und Organmanifestation seien, oder ob es sich um unterscheidbare Viren handelt, die verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen, beschäftigte schon verschiedene Autoren.

Die in der Literatur beschriebenen Uebertragungsversuche sprächen dafür, dass man es mit identischen Viren zu tun hätte. Denn einerseits wurde festgestellt, dass sowohl die Virusstämme, die bei Rindern Infektionen verursachten (Stomatitis papulosa, Euterpocken), als auch schafpathogene Pustulardermatitisviren auf den Menschen übertragen werden konnten (21). Die dadurch verursachten Läsionen auf der menschlichen Haut waren klinisch nicht differenzierbar (21). Pustulardermatitis Viren waren andererseits auch auf das Kalb zu übertragen (1) und mit Euterpockenmaterial liessen sich beim Kalb die typischen Stomatitis papulosa-Läsionen, aber auch Pustulardermatitis-Läsionen beim Schaf erzeugen (11,14,22). Weiter wurde beobachtet, dass die Erreger der Euterpocken, der Stomatitis papulosa, des Melkerknotens des Menschen und des Pustulardermatitis-Virus vom Schaf antigen untereinander sehr eng verwandt sind.

Dies führte zu Nomenklaturschwierigkeiten, die besonders in der Humanmedizin zutage traten.

Es ist deshalb schon früh versucht worden, den Verwandtschaftsgrad der Parapockenviren untereinander zu bestimmen. Die Versuche verschiedener Autoren, Parapockenviren zu differenzieren, sollen in der Folge kurz dargestellt werden.

a) Immunologische Differenzierung

Differenzierungsversuche mittels neutralisierenden Ak wurden vor allem von Liebermann et al. (15) durchgeführt. Nur durch

Induktion von Hochimmunseren erhielten sie brauchbare Neutralisationstiter. Diese zeigten aber Kreuzreaktionen mit allen Parapockenvirusisolaten, so dass serologisch keine Differenzierung möglich war. Neutralisationskinetische Untersuchungen von Wittek et al. (37) bestätigten den hohen immunologischen Verwandtschaftsgrad aller untersuchten Stämme. Auch Liebermann (16) gelang eine Differenzierung mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Technik an zytoplasmatischen Einschlusskörperchen nicht. Er stellte dabei ebenfalls starke Kreuzreaktionen unter den Parapockenvirus-Stämmen fest.

b) Differenzierung anhand des zytopathischen Effektes (ZPE)
Nagington (23) versuchte mittels Analyse des zytopathischen Effektes und der Replikationskinetik in Zellkulturen zur Differenzierung geeignete Merkmale zu finden. Pustulardermatitis Virusstämme liessen sich in den ersten Passagen nur in ovinen Zellen vermehren, sie bildeten in den Monolayern einen "geschlossenen" ZPE. Rinderparapockenvirus-Isolate dagegen führten zu einem "offenen" ZPE mit totaler Lysis des Zellrasens und liessen sich sowohl auf ovinen wie auf bovinen Zellen vermehren. Unterschiede in der Replikation in Hodenzellen von Rind und Schaf und menschlichen Amnionzellen stellte er zwischen Pustulardermatitis-, Euterpocken- und Stomatitis papulosa Stämmen keine fest. Histologisch war es ihm wie auch Plowright und Ferris (25) aber möglich, Schafisolate von Rinderisolaten zu unterscheiden. Nagington schlug deshalb eine Einteilung nach Herkunft des infektiösen Materials und dem verursachten Krankheitsbild vor.

c) Differenzierung aufgrund elektronenoptischer Veränderungen in virusinfizierten Zellen

Pospischil und Bachmann (26) wiesen bei natürlicher Infektion mit Stomatitis papulosa- und Euterpockenviren in den Zellkernen elektronenoptisch tubuläre, aus Doppelmembranen bestehende Strukturen nach. Bei natürlichen Infektionen mit

Pustulardermatitis-Stämmen fanden sie stets filamentöse Strukturen im Zellkern. Diese Erscheinungen liessen sich auch auf Zellkulturen reproduzieren, aber bei den Pustulardermatitis Viren traten in vitro neben den filamentösen auch die tubulären Strukturen auf.

d) Differenzierung mit Hilfe der Restriktionsanalyse

Bakterielle Restriktionsenzyme sind spezifische Endonukleasen, welche doppelsträngige DNA Moleküle an bestimmten Stellen, den sogenannten Erkennungssequenzen, schneiden. Dabei entsteht ein Gemisch von spezifischen Fragmenten, welche mit Hilfe der Gel-Elektrophorese nach Grösse getrennt werden können und dadurch ein charakteristisches Bandenmuster ergeben.

Sind zwei Viren sehr nahe miteinander verwandt, werden die meisten Erkennungssequenzen an identischen Positionen auf den beiden DNA Molekülen vorhanden sein. Nach Verdauung mit einem Restriktionsenzym und elektrophoretischer Trennung der DNA Fragmente wird man daher ein sehr ähnliches Bandenmuster erhalten. Je weiter entfernt verwandt die beiden Viren miteinander sind, desto verschiedener wird das Bandenmuster werden.

Die Restriktionsanalyse hat sich zur Klassifizierung der Orthopockenviren sehr gut bewährt und ist heute die Methode der Wahl für die Differenzierung von sehr nah verwandten Vertretern (5,8,17,20).

Da eine eindeutige Differenzierung der Parapockenviren mit den bisher erwähnten Methoden nicht möglich war, haben verschiedene Autoren versucht, Isolate von Parapockenviren mittels der Restriktionsanalyse zu klassifizieren (27,29,37). Alle Autoren stellten eine grosse genetische Heterogenität der untersuchten Parapockenviren fest. Trotzdem konnten vorläufig sowohl Wittek et al. (37), als auch Raymann (27) die untersuchten Isolate verschiedener Untergruppen mit Ver-

tretern mit recht ähnlichen Bandenmustern zuordnen. Isolate verschiedener Untergruppen wiesen untereinander jedoch sehr grosse Unterschiede auf.

2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Die bisher vorliegenden Restriktionsmuster der Parapocken-virusstämme zeigten im Vergleich untereinander eine sehr grosse Variabilität, die eigentlich aufgrund der engen anti-genen Verwandtschaft nicht zu erwarten war. Ein neues Para-pockenvirus Isolat könnte daher allein aufgrund seines Restriktionsmusters nicht eindeutig als Pustulardermatitis-, Stomatitis papulosa- oder Euterpockenvirus identifiziert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Differen-zierungskriterien zu finden, die eine klare Einteilung in drei nach den Krankheitsbildern postulierte Subgenera er-lauben würden.

In Analogie zu den Orthopockenviren (17,34) konnte angenommen werden, dass die DNA Sequenzen in bestimmten Regionen des Parapockenvirus Genoms ebenfalls stärker konserviert sind als in anderen Bereichen. Es schien daher nicht unmöglich zu sein, dass DNA Sequenzen im Genom verschiedener Para-pockenviren gefunden werden könnten, welche eine grössere Homologie nur zwischen Vertretern des gleichen Subgenus auf-weisen würden. Damit stünden eindeutige Klassifizierungs-merkmale zur Verfügung.

Zur Lösung dieser Aufgabe waren folgende Arbeiten durchzu-führen:

1. Viele der von Raymann untersuchten Parapockenvirus-Isolate zeigten Restriktionsmuster mit submolaren Banden, welche auf eine Heterogenität in der Viruspopulation

schliessen liessen. Um genetisch einheitliche Stämme zu erhalten, sollten alle uns zur Verfügung stehenden Virus-isolate einer Plaquereinigung unterzogen werden.

2. Um die Position der Restriktionsfragmente auf dem Genom der verschiedenen Parapockenviren bestimmen zu können, mussten die Schnittstellen der Endonukleasen Eco RI und Hind III auf dem doppelsträngigen Virus DNA-Molekül kartographiert werden.
3. Basierend auf den Restriktionskarten sollten bestimmte Genom-Segmente ausgewählt, radioaktiv markiert, und auf die DNA anderer Isolate hybridisiert werden. Diese Versuche sollten erlauben, Pustuladermatitis-, Stomatitis papulosa- oder Euterpocken-spezifische Regionen auf der Virus DNA zu erkennen und zu lokalisieren, um damit die Basis für die Differenzierung zu schaffen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Parapockenvirusisolate

In dieser Arbeit wurden 15 der 20 von Raymann (27) gesammelten und restringierten Virusisolate einer eingehenderen Analyse unterzogen.

a) Isolate aus Stomatitis papulosa-Läsionen:

V 660	Prof. Dr. A. Mayr, München
R 1781	Prof. Dr. F. Steck, Bern
R 1374	Prof. Dr. F. Steck, Bern
69558	Dr. P. Rondhuis, Rotterdam
69559	Dr. P. Rondhuis, Rotterdam
VR 801	ATCC, Rockville, Maryland
66/1456	Dr. C. Castrucci, Perugia
M 20/4	Staatl. Veterinärprüfanstalt, Berlin DDR

b) Isolate aus Euterpocken-Läsionen:

VR 634	ATCC, Rockville, Maryland
174/77	Dr. A. Metzler, Zürich
P 4/4	Staatl. Veterinärprüfanstalt, Berlin DDR

c) Isolate aus Ecthyma contagiosum-Läsionen:

Ch 32/H	Prof. v. Bekkum, Lelystad, Holland
60898	Veterinaria AG, Zürich
Souche 2	IFFA Merieux, Lyon
XIVa	Dr. Pilaski, Düsseldorf

3.2. Zellkulturen

Als Wirtszellen für die Virusvermehrung verwendeten wir Lungenzellen von 3 - 5 Monate alten Rinderföten (eBLC). Diese wurden nach Standardmethoden der Autoren Mayr et al. (18) und Goldsmit & Barzilai (10) kultiviert. Das heisst: Die Föten wurden vom Schlachthof der Stadt Zürich bereitgestellt und am Tag des Schlachtens verarbeitet. Nach Desinfektion der Haut wurden die Lungen mit sterilen Instrumenten aus dem Thorax entfernt, die Bronchien grösstenteils vom Lungengewebe abgetrennt und das Parenchym mit Schere und

Pinzette fein zerschnitten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-A wurden noch vorhandene Gewebestückchen nochmals zerschnitten und mit 0,25% (w/v) trypsinhaltigem (Trypsin 1:250, Difco Laboratories, Detroit, USA) PBS-A während ca. 45 Min. unter ständigem Rühren bei 35°C inkubiert. Vom dadurch grösstenteils aufgelösten Zellverband wurden die Bronchien- und Gewebsresten durch sterile Gaze abfiltriert und die so gewonnene Zellsuspension bei 800 g während 10 Min. zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in E'MEM mit Hank's Salzen (Boehringer, Mannheim) enthaltend 10% fötales Kälberserum (FCS) (Nabi Florida, USA) resuspendiert und in Kulturflaschen der Marke Corning (Corning Glassworks, New York, USA) mit 25 cm² Bodenfläche ausgesät. Zur Verhütung einer bakteriellen und mykotischen Kontamination fügte man 10⁵E Penicillin, 100 mg Streptomycin und 1 mg Econazol (Cilag Chemie AG, Schaffhausen) pro Liter Nährmedium bei. Bei den Primärkulturen erfolgte nach 24 Stunden ein Mediumwechsel. Im Durchschnitt waren die Zellrasen nach 48 bis 72 Stunden zu einem konfluenten Monolayer ausgewachsen. Zur Passage wurden die Zellrasen mit kaltem PBS-A gewaschen, und mit ATV (= PBS-A; 1,25 g/l Trypsin 1:250; 0,25 g/l EDTA) nachgespült. Nach zehn-minütiger Inkubation bei 37°C hatten sich jeweils die Zellen abgelöst und konnten auf die dreifache Flaschenfläche neu ausgesät werden. Das Erhaltungsmedium enthielt 2% FCS.

3.3. Virusvermehrung und Plaquereinigung

Virushaltiges Zellmaterial schloss man durch zwei bis dreimaliges Gefrieren und Tauen auf, um die grösstenteils zellgebundenen Parapockenviren freizusetzen. Zur Infektion einer 175 cm² Zellkulturflasche wurde eine Virussuspension von 10⁷ - 10⁸ TCID₅₀ in 5 ml E'MEM hergestellt und mit 20 Einheiten lyophilisiertem Trypsin (Millipore Corporation Freehold, NJ 07728) bei 37°C während 30 Min. inkubiert,

anschliessend auf den mit PBS-A gewaschenen Zellrasen gegeben. Dies entsprach einer Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection MOI) von 1-10 TCID₅₀ pro Zelle. Nach einer Adsorptionszeit von 60 bis 90 Min. saugten wir die nicht adsorbierten Viruspartikel ab und dem Zellrasen wurden ca. 20 ml Erhaltungsmedium zugegeben. Nach 3 - 5 Tagen Inkubation bei 34°C zeigten die Zellrasen einen ZPE von 80 - 90% und konnten zur Aufarbeitung eingefroren werden.

Zur Reinigung unserer Virusisolate verwendeten wir die Plaqueisolationstechnik nach Mayr et al. (18). Auf Costarplatten (Tissue Culture Cluster, Costar, 205 Broadway, Cambridge, Mass.) mit 24 Dellen à 2 cm² bewachsen mit eBLC titrierte man die Infektionssuspensionen so aus, dass in die erste Delle eine Virussuspension mit 100 und in die achte Delle noch 0,8 TCID₅₀ Viren eingefüllt wurden. Nach 30 Min. Adsorptionszeit bei 34°C wurde die überstehende Flüssigkeit aus den Dellen abgesogen und der Zellrasen mit 1 ml E'MEM, enthaltend 0,6% Low Melting Agarose (Sea Plaque, Marine Colloids Div. FMC Corp., Rockland, USA) überschichtet. Nach 8 bis 10 Tagen Inkubationszeit bei 34°C war auch bei niedrigen Infektionsdosen ein zytopathischer Effekt sichtbar. Nach fünfständiger Anfärbung mit Neutralrot waren die Plaques von blossem Auge sichtbar und konnten mit einer Pasteurpipette ausgestochen werden. Mit diesen Isolaten infizierten wir je eine mit eBLC bewachsene 25 cm² Corning Flasche. Bei erfolgter Virusvermehrung war nach 6 - 8 Tagen ein deutlicher ZPE sichtbar.

3.4. Virusreinigung

Die Reinigung der Viren erfolgte mit der von Joklik et al. (12) beschriebenen und von uns modifizierten Methode. Die infizierten Zellkulturen wurden zweimal gefroren und getaut, dann Zellen wie Ueberstand in Zentrifugenbecher abgefüllt

und während 2 Std. bei 25'000 g zentrifugiert. Die Sedimente wurden im ca. zehnfachen Volumen einer Lösung bestehend aus 10 mM Tris pH 9 und 1 mM EDTA aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Dieses Homogenisat wurde durch ein 36% (w/v) Saccharosekissen mit 130'000 g während 40 Min. sedimentiert (Beckman SW 27 Rotor 27'000 rpm). Das Volumen des Saccharosekissens betrug 1/4 des Volumens des Zentrifugenröhrchens. Mehrere Sedimente wurden in 4 - 5 ml 10 mM Tris pH 9; 1 mM EDTA vereinigt, homogenisiert und 20 Einheiten lyophilisiertes Trypsin pro ml zugegeben und während 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nachher wurde diese Suspension in einem kontinuierlichen 20 - 50% (w/v) Saccharosegradienten in 10 mM Tris pH 9; 1 mM EDTA während 30 Min. bei 95'000 g (Beckman SW 27 Rotor, 23'000 rpm) zentrifugiert. Die Parapockenviren bildeten dabei eine klar abgegrenzte Bande etwas unterhalb der Mitte des Gradienten. Diffuse oder dunkelbraune Virusbanden entstanden bei ungenügender Trypsineinwirkung. Am Boden der Gradienten bildete sich jeweils ein Sediment, das zu einem grossen Teil aus zusammengeklumpten Viren bestand. Diese Sedimente wurden vereinigt und nochmals wie vorhergehend mit Trypsin behandelt und erneut auf einen Gradienten geladen. Die Virusbanden wurden mittels einer Schlauchpumpe durch eine Glaskapillare aus dem Gradienten abgesogen, vereinigt, und die Saccharosekonzentration mit einer Lösung bestehend aus 10 mM Tris pH 9; 1 mM EDTA auf einen Drittel reduziert und anschliessend während 45 Min. bei 48'000 g sedimentiert (Sorvall SS 34 Rotor, 20'000 rpm).

Gut sichtbare, saubere Virussedimente hatten eine weisse bis bläuliche Farbe, schmutziges Braun hingegen wies auf Reste von Zelltrümmern hin. Drei bis vier deutlich sichtbare Sedimente wurden jeweils zusammen in 1 - 2 ml 50 mM Tris pH 7,8; 1 mM EDTA resuspendiert und bei -20°C tiefgefroren. Die Arbeiten wurden soweit möglich bei einer Temperatur von 0°C ausgeführt, und die Zentrifugation erfolgte bei 4°C.

3.5. DNA Extraktion

Die Virussuspension in 50 mM Tris pH 7,8; 1 mM EDTA wurde auf 27% Saccharose und 5% SDS (Sodiumdodecylsulfat, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) ergänzt und pro 1 OD₂₆₀ Viren gaben wir 40 µg Proteinase K (Boehringer, Mannheim, BRD) hinzu, inkubierten im 55°C Wasserbad während 1 Stunde unter sporadischem Umrühren. Nach einer Zugabe von 1/10 Volumen 2 M NaTCA pH 7,5 (Trichloressigsäure mit NaOH neutralisiert) wurde die Lösung mit 2 Volumen Phenol-Chloroform (1:1), wassergesättigt, während ca. 30 Min. unter dauernder End-über Endrotation bei Zimmertemperatur extrahiert. Bei der anschliessenden Zentrifugation während 5 Min. bei 1500 g wurde die DNA-haltige Wasserphase von der Phenol-Chloroform-phase (unten) getrennt. Dazwischen bildete sich eine weisse Interphase, welche mitsamt der Wasserphase abgehebert und erneut extrahiert wurde, bis nur noch eine kaum sichtbare Interphase entstand. Die soweit gereinigte Wasserphase wurde abschliessend mit 2 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) während 15 Min. extrahiert. Die nun reine DNA wurde mit 2 Volumen absolutem Aethanol aus der Wasserphase präzipitiert und bei -20°C mindestens 2 Stunden stehen gelassen. Das Präzipitat wurde anschliessend mit 20'000 g während 20 Min. pelletiert, das Sediment mit 80% Aethanol nachgewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Ein gut sichtbares DNA Sediment wurde in ca. 1 ml 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA aufgelöst.

3.6. DNA Restriktion

Für die DNA Restriktion wurden die Endonukleasen Eco RI und Hind III (Boehringer, Mannheim, BRD) verwendet. Der Inkubationspuffer für beide Enzyme bestand aus 100 mM Tris pH 7,2; 6 mM MgCl₂; 60 mM NaCl und 100 µg/ml BSA (bovines Serumalbumin). Die Inkubationszeiten betrugen für beide Enzyme 1 Std.

bei 37°C, danach wurde durch den Zusatz von einem Fünftel Volumen einer Lösung bestehend aus 12% Ficoll (Ficoll 400, Pharmacia Fine Chemicals AG, Uppsala, Sweden) 100 mM EDTA und 0,03% Bromphenolblau, die Enzymreaktion gestoppt. Doppelverdauungen wurden im vorgängig beschriebenen Inkubationspuffer durch gleichzeitige Zugabe beider Endonukleasen ausgeführt.

3.7. Agarose Gelelektrophorese

Die Elektrophoresetechnik wurde grösstenteils nach den Angaben von Müller et al. (20) ausgeführt. Die Pufferlösung bestand aus 40 mM Tris; 2 mM EDTA und 20 mM Eisessig pH 8,1. Die Grösse des vertikalen Gels war normalerweise 17 x 17 x 0,5 cm. Die Proben wurden zu analytischen Zwecken in 0,5 oder 1 cm breite Kerben geladen. Für präparative Gele verwendeten wir 7 cm breite Kerben. Zur analytischen Auftrennung der DNA Banden genügte die Elektrophorese Agarose Typ II, Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), für präparative Arbeiten verwendeten wir hingegen eine Agarose mit höherem Reinheitsgrade, nämlich Bio Rad Standard Low -mr, (Bio Rad, Richmond, Kalifornien). Die Isolation von Banden mit hohen und nahe beisammenliegenden Molekulargewichten bereitete öfters etwas Mühe. In einem ersten Schritt wurden die kleinen Fragmente isoliert und im zweiten Schritt, aus einem Gel, mit drei bis vierfacher Laufzeit die Problembanden herausgeschnitten. Die Standardspannung für ein analytisches Gel betrug 2 Volt pro cm Gel bei einer Laufzeit von ca. 17 Stunden. Falls nur kleine Fragmente getrennt werden mussten, konnte mit Spannungen bis 5 V/cm und entsprechend kürzerer Zeit gearbeitet werden.

Zur Sichtbarmachung der DNA Banden wurden die Gele in Elektrophoresepuffer, enthaltend 1 µg Ethidiumbromid pro ml, während 30 Min. in abgedunkelter Umgebung angefärbt. Bei Bestrahlung mit UV Licht leuchteten die DNA Banden auf und

konnten durch einen Rotfilter fotografiert werden (Ilford HP-4 Planfilm, 10,2 x 12,7 cm oder Polaroid High Speed 4 x 5 Land Film, 36 Din.). Für Bilder von analytischen Gelen verwendeten wir wegen der besseren Leuchtkraft kurzwelliges UV Licht, zur Lokalisierung von Banden in präparativen Gelen kam langwelliges UV Licht zur Anwendung, welches weniger Brüche in der DNA verursacht.

3.8. Reinigung und Isolation von DNA Fragmenten

Die zu reinigenden DNA Banden wurden unter langwelligem UV Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose Gel herausgeschnitten und nach der Methode von Vogelstein und Gillespie (33) die DNA isoliert. Die Gelstücke wurden mit dem 2½-fachen Volumen von gesättigter NaJ-Lösung verflüssigt. Die nun freie DNA wurde mit 40 µl einer 50% Glaspulver Suspension in Wasser versetzt (Silica 325 mesh, Eagle Ceramics, Rockville) und bei konstanter End über End-Rotation während 12 Stunden bei 4°C adsorbiert. Danach wurde das Glaspulver bei 1500 g während 5 Min. sedimentiert und anschliessend zweimal mit 60% gesättigter NaJ-Lösung 1 Stunde lang gewaschen und in gleicher Weise sedimentiert. Zum Entfernen des Natriumjodids wurden die Sedimente mit einer Lösung bestehend zur Hälfte aus Aethanol und TNE (10 mM Tris pH 7,2; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) zweimal gewaschen. Die adsorbierte DNA wurde darauf zweimal mit 150 µl 0,2 M NaCl, 50 mM Tris pH 9 in einem Eppendorf Reaktionsgefäß bei 50°C während 15 Min. eluiert. Die DNA haltigen Ueberstände wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vereinigt und mit 800 µl reinem Aethanol bei -20°C während mindestens 2 Stunden ausgefällt. Die präzipitierte DNA wurde 2 Min. in der Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert, getrocknet und wieder gelöst in 40 µl 50 mM Tris pH 7,6; 1 mM EDTA.

3.9. Bestimmung der Endfragmente

Zur Bestimmung der Endfragmente wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die beiden DNA Stränge des Parapockenvirus Genoms an beiden Enden kovalent verbunden sind ("Crosslinks") (19). Ungefähr 0,8 µg DNA wurde mit dem gewünschten Enzym in einem normalen Restriktionsansatz verdaut. Nach Zugabe von 20 µl 400 mM EDTA; 2 M NaCl wurde eine Phenol-Chloroform und eine Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion durchgeführt, wie sie bei der DNA Reinigung beschrieben wurde. Nach der Alkoholfällung wurde das getrocknete Sediment in 30 µl 50 mM Tris pH 7,6; 1 mM EDTA resuspendiert. Ein Drittel diente als Referenz für das vollständige Bandenmuster, im Rest wurde die EDTA Endkonzentration auf 15 mM ergänzt, mit 1/6 Volumen 1M NaOH während 15 Min. bei 37°C denaturiert und anschliessend mit BPB-Ficoll-EDTA neutralisiert und unverzüglich neben der Kontrolle auf das Gel geladen. Die Elektrophorese Spannung betrug auch hier meistens 2 V/cm und die Gelkonzentration 0,6% Sigma Typ II Agarose.

Die terminalen Fragmente mit den "Crosslinks" konnten sich in dieser kurzen Neutralisationszeit wieder renaturieren, während die übrigen Fragmente einzelsträngig ins Gel einliefen und nur schwach sichtbare Banden zwischen den Banden des Referenzmusters bildeten. Die beiden Endfragmente jedoch verhielten sich wie ihre entsprechenden Partner im Referenzmuster.

3.10. Radioaktive Markierung

Die isolierten Parapockenvirus-DNA wurde in vitro mit der Nick Translation Technik (28) mit α (32)P-dCTP radioaktiv markiert. CTP wurde aufgrund des hohen GC-gehaltes der Parapockenvirus DNA gewählt (Wittek et al. (36), Thomas et al. (32)). Das Reaktionsgemisch bestand aus: 50 mM Tris pH 7,8;

5 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol und 25 µg/ml BSA. In einem Volumen von 40 µl wurden 100 ng DNA mit 800 p Mol dATP, dTTP, dGTP (Boehringer, Mannheim) 10 µCi α(32)P dCTP (3000 Ci/mMol) (Amersham, Buckinghamshire, England) und 8 Einheiten DNA Polymerase I (Boehringer, Mannheim) während 2 Stunden bei 14°C markiert. Zur Trennung der DNA von nicht eingebauten Nukleotiden wurde das Reaktionsgemisch durch eine Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals AG, Uppsala, Schweden) Säule filtriert.

3.11. Transfer von DNA Fragmenten

Für den Transfer von DNA auf die von uns verwendete Gene Screen Membran (New England Nuclear Corp.) gossen wir Gele mit 7 cm breiten Kerben und beluden sie mit 8 µg Eco RI oder Hind III verdauter DNA. Nach einem Elektrophoreselauf unter normalen Bedingungen wurde das Gel fotografiert und die DNA nach der Technik von Southern (31) und den speziellen NEN Instruktionen auf die Membran transferiert. Das Gel wurde während 30 Min. in 0,2 N NaOH; 0,6 M NaCl inkubiert und wieder 30 Min. bei Raumtemperatur in 0,5 M Tris-HCl pH 7,6; 1,5 M NaCl neutralisiert. Dann wurde das Gel auf eine Glasplatte in einer Schale plaziert, darüber die in 0,025 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6,5 befeuchtete Membran gelegt und darauf ein Saugturm mit Whatman 3MM (Whatman Limited, England) Filtern und Papiertaschentüchern errichtet. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet (1x SSC = 0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumcitrat). Damit der Transferpuffer nicht ausserhalb der Transfermembran durchfliessen konnte, wurde eine Plastikfolie mit einem membrangrossen Fenster dazwischen gelegt. Nach 12 oder mehr Stunden wurde die Membran sorgfältig entfernt, im Transferpuffer gewaschen und im Vakuumofen bei 100°C während 4 Stunden getrocknet.

3.12. Hybridisation

Für die Hybridisationsversuche wurden die Membranen mit der transferierten DNA in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und in Denhardt's Lösung (4) (0,02% Ficoll; 0,02% BSA; 0,02% Polyvinylpyrrolidin) 4 x SSC und 200 µg/ml hitzedenaturierter Kalbsthymus DNA während 6 Stunden bei 65°C präinkubiert. Die Hybridisation selbst erfolgte in einem Reaktionsgemisch bestehend aus: 4x SSC, 1x Denhardt's Lösung, 100 µg/ml denaturierter Kalbsthymus DNA, sowie ca. 10^6 cpm (Cerenkov Zählung) durch Nick-Translation markierter und ebenfalls hitzedenaturierter DNA. Die Hybridisationszeit betrug 12 Stunden bei 65°C. Anschliessend wurden die Membranen nach den Instruktionen des Herstellers mehrmals gewaschen, getrocknet und die markierten Banden durch Autoradiografie mit Kodak X - Ray Film X 5 SO - 282 sichtbar gemacht.

3.13. DNA-Längenstandard

Als DNA-Längenstandard verwendeten wir Lambda DNA cl 857 Sam 7 (Boehringer, Mannheim, BRD) mit einem Molekulargewicht von $32,3 \times 10^6$. Ein Gemisch bestehend aus: a) unverdauter, b) Xho I verdauter, c) Eco RI/Hind III doppeltverdauter DNA ergab die folgenden Standardmolekulargewichte: 32,3/22,3/14,3/10/3,4/3,3/2,8/2,3/1,3/1,04/0,9/0,62/0,55/0,37 $\times 10^6$.

4. RESULTATE

4.1. Restriktionsanalyse

Die DNA's von 15 plaquegereinigten Parapockenvirusstämmen wurden mit den Endonukleasen Eco RI und Hind III restringiert. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die entsprechenden Gelelektrophoresemuster, und in den Tabellen 1 und 2 sind die Molekulargewichte der Fragmente zusammengestellt. Im Gegensatz zu den Mustern vor der Plaquereinigung (27), traten keine submolaren Banden mehr auf. In den Legenden zu diesen Abbildungen und in den folgenden Tabellen und Darstellungen werden die von Pustulardermatitis Läsionen stammenden Isolate Ch 32/H (Bahn 9 in Abb. 2 und 3) und 60898 (Bahn 10 in Abb. 2 und 3) bereits unter den Stomatitis papulosa Stämmen aufgeführt. Die Restriktionsmuster der Stämme Ch32/h und 60898 unterschieden sich augenfällig von den Pustulardermatitis Stämmen Souche 2 und XIVA und zeigten dafür aber grosse Aehnlichkeiten mit den Stomatitis papulosa Stämmen M 20/4 (Bahn 7 in Abb. 2 und 3) und 66/1456 (Bahn 8 in Abb. 2 und 3). Besonders offensichtlich ist dies im Eco RI Muster des Stammes Ch 32/H (Abb. 2). In beiden Fällen rechtfertigten die Hybridisationsergebnisse, auf die später eingegangen wird, diese Umteilung. Durch diese vorgezogene Umgruppierung wurde die Beschreibung und Präsentation der Ergebnisse leichter verständlich.

Ein charakteristisches Parapockenvirus Restriktionsmuster, welches Gemeinsamkeiten mit allen untersuchten Stämmen aufgewiesen hätte, und damit erlauben würde, ein neues Isolat eindeutig als Parapockenvirus zu identifizieren, konnte nicht gefunden werden. Sogar unter den Isolaten des gleichen Subgenus traten recht grosse Unterschiede auf. So unterschieden sich die drei Isolate M 20/4, 66/1456 und Ch 32/H (Bahnen 7, 8 und 9 in Abb. 2 und 3) deutlich von den übrigen Isolaten der Stomatitis papulosa Viren, bildeten aber unter-

einander eine recht homogene Gruppe, was besonders im Eco RI Muster (Abb. 2) deutlich wird. Im Hind III Muster (Abb. 3) traten aber auch bei diesen 3 Isolaten deutliche Unterschiede auf. Andererseits sind aber auch Gemeinsamkeiten bei den Stomatitis papulosa-Isolaten vorhanden. So trat ein Eco RI Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 3.5×10^6 bei 7 der 10 untersuchten Stämme auf (Abb. 3), und alle Vertreter besaßen ein Hind III Fragment mit einem ähnlichen Molekulargewicht zwischen 6.1 und 6.5×10^6 (Abb. 3).

Die beiden Pustuladermatitis Isolate ergaben ein ähnliches Muster mit Eco RI, unterschieden sich aber deutlich in ihren Hind III Mustern. Die zwei untersuchten Pustuladermatitis Viren zeigten zwar sehr ähnliche Restriktionsmuster, aber die Untersuchungen von Robinson et al. (29) ergaben auch für diesen Subgenus eine grössere Variabilität,

Die drei Euterpocken Isolate schliesslich wiesen gewisse Gemeinsamkeiten als auch deutliche Unterschiede sowohl in Eco RI als auch in Hind III Mustern auf.

Die Restriktionsanalysen der Plaque gereinigten Isolate bestätigten die genetische Heterogenität der Parapockenviren, welche sowohl von Raymann (27) als auch von Wittek et al. (37) gefunden worden war.

Abb. 2:

Eco RI Restriktionsmuster von 15 Parapockenvirus-Stämmen.

Die DNA Fragmente wurden in einem 0.6% Agarose Gel bei 2 V/cm während 17 Stunden getrennt. Die DNA wurde anschliessend mit Ethidiumbromid gefärbt. Schwach sichtbare und nahe beisammenliegende Banden sind mit einem Pfeil markiert.

Bahn 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

(1)V 660; (2)VR 601; (3) 69559; (4)R1374; (5)R1781;
(6)69558; (7)M20/4; (8)66/1456; (9)Ch 32 H; (10)60898

Bahn 11 - 12: Pustuladermatitis-Stämme

(11)Souche 2 (S2); (12)XIVa

Bahn 13 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634; (14)P4/4; (15)174/77



Abb. 3:

Hind III Restriktionsmuster von 15 Parapockenvirus-Stämmen.

Die DNA Fragmente wurden in einem 0.6% Agarose Gel bei 2 V/cm während 17 Stunden getrennt und anschliessend mit Ethidiumbromid gefärbt. Schwach sichtbare und nahe beisammenliegende Banden sind mit einem Pfeil, doppelt molare mit einem Stern markiert.

Bahn 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

(1)V660; (2)VR 801; (3)69559; (4)R1374; (5)R1781;
(6)69558; (7)M 20/4; (8)66/1456; (9)Ch 32 H; (10)60898

Bahn 11 u. 12: Pustular dermatitis-Stämme

(11)Souche 2 (S2); (12)XIVa

Bahn 13 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634; (14)P4/4; (15)174/77



Tabelle 1: Molekulargewichte der Eco RI DNA

Restriktionsfragmente von 15 Parapockenvirusstämmen (MG in Millionen)

Subgenera:	Stomatitis papulosa										Pustular- dermatitis		Euterpocken		
Stämme:	V 660	VR 801	69559	R 1374	R 1781	69558	M 20/4	66/1456	Ch 32/H	60898	S 2	XIV a	VR 634	P 4/4	174/77
Fragmente:															
A	29,7	32,0	45,6	43,0	43,0	39,0	28,0	28,4	30,0	34,9	40,5	42,4	44,2	40,0	38,5
B	24,9	29,0	17,4	21,0	20,2	20,6	22,7	23,0	27,0	21,0	29,0	30,0	32,0	33,0	33,0
C	13,1	14,5	17,1	13,5	13,5	13,2	15,1	15,4	15,2	13,0	8,0	7,8	12,5	8,2	8,0
D	9,17	9,5	12,5	12,0	11,5	10,5	14,6	14,6	14,6	10,0	7,0	7,0	4,3	8,0	4,3
E	6,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	12,0	11,0	11,2	3,5	3,4	2,4	3,6	4,1	3,8
F	3,35									1,1	2,4	1,9	0,6	1,45	3,6
G											0,95	1,0			1,3
H															1,25
MG x 10 ⁶	86,72	88,4	96,0	92,9	91,6	86,7	91,4	92,4	98,0	93,5	91,25	92,5	97,2	94,75	93,75

Tabelle 2: Molekulargewichte der Hind III DNA

Restriktionsfragmente von 15 Parapockenvirusstämmen (MG in Millionen)

Subgenera:	Stomatitis papulosa										Pustular- dermatitis	Euterpocken			
Stämme:	V 660	VR 801	69559	R 1374	R 1781	69558	M 20/4	66/1456	Ch 32/H	60898	S 2	XIV a	VR 634	P 4/4	174/77
Fragmente:															
A	35,5	36,0	56,0	72,1	73,0	65,35	60,0	34,2	60,0	48,6	59,0	59,0	29,5	31,0	25,0
B	18,0	19,5	21,1	13,0	12,5	11,2	12,5 *	27,0	19,2	21,0	12,5	13,6	23,0	19,5	21,8
C	11,1	12,0	12,5	6,4	6,2	6,2	6,2	12,5 *	12,5	12,5	6,9	8,7	16,5	11,5	12,25
D	10,0	10,5	6,5			2,9		6,2	6,1	6,4	5,6	5,5	14,25	8,6	8,5
E	6,2	6,1				1,06				3,2	2,8	4,25	8,7	6,8	6,6
F	4,4	3,1								1,3	2,2	2,85	2,75	3,7	5,4
G		1,24									1,25	2,2	2,5	3,4	3,4
H											0,75	1,2		3,3	2,8
I											0,60	0,70		3,05	2,6
J												0,60		2,05	2,5
K														2,0	2,1
L															0,65
MG x 10 ⁶	85,2	88,4	96,1	91,5	91,7	86,71	91,2	92,4	97,8	93,0	91,6	92,6	97,2	94,9	93,6

4.2. Erstellung von Restriktionskarten

Die untersuchten Parapockenvirus Isolate wiesen in der Restriktionsanalyse eine zu grosse Variabilität auf, um eine Klassifikation allein aufgrund des Fragmentmusters zu erlauben. Wie in der Problemstellung der Arbeit bereits erwähnt, sollte daher versucht werden, DNA Sequenzen zu lokalisieren, welche nur mit Vertretern der gleichen Subgenera hybridisierten. Dazu mussten Restriktionskarten erstellt werden, welche die Lokalisation von Restriktionsfragmenten auf dem DNA Molekül erlauben und die Basis für die Auswahl bestimmter Genom-Segmente für die Hybridisierungsversuche bilden. Die Erstellung der Restriktionskarten erfolgte nach Menna et al. (19).

Die ersten Anhaltspunkte ergaben die Bestimmungen der Endfragmente. Dazu setzten wir voraus, dass alle Parapockenviren analog zu den Orthopockenviren terminale kovalente Bindungsstellen im DNA-Molekül aufweisen. (3,9). Bei solchen Endfragmenten ist bekannt, dass sie nach alkalischer Denaturierung und anschliessender Neutralisation rasch wieder renaturieren und so elektrophoretisch von den übrigen Fragmenten getrennt werden können (6).

Wichtige Grundlagen für die Erstellung der Restriktionskarte ergaben Doppelverdauungsexperimente von isolierten Eco RI Fragmenten mit Hind III und umgekehrt. Diese neuen, doppelt verdauten Banden wurden verglichen mit doppelt verdauter, totaler DNA. Sich überlappende Eco/Hind-Fragmente zeigten nun Teilfragmente, wie sie bei der Doppelverdauung totaler DNA entstanden. Daraus konnte man Gruppen angrenzender Fragmente bilden. Falls diese Informationen noch nicht genügten, wurde DNA mit einem Enzym durch Verkürzung der Inkubationszeit und drastischer Reduktion der Enzymmenge nur teilweise verdaut. Dadurch entstanden neue, grössere Fragmente, welche nach Isolation aus dem Elektrophoresegel mit dem gleichen Enzym nach-

geschnitten wurden. Dadurch wurden zusammenhängende Fragmente direkt nachgewiesen.

Allfällige Restprobleme konnten auch teilweise mit der Hybridisation gelöst und nachkontrolliert werden.

Einzelne, kleine, aneinandergrenzende Fragmente, deren genaue Lokalisation nur mit sehr viel Aufwand möglich gewesen wäre, wurden mit einem Stern bezeichnet und in der vermuteten Reihenfolge aufgeführt.

4.3. Eco RI und Hind III Restriktionskarten für die DNA von 12 Parapockenviren

Mit den vorgängig beschriebenen Methoden wurden für die DNA von 12 der 15 mit der Restriktionsanalyse untersuchten Parapockenviren Restriktionskarten erstellt (Abb. 4).

Die Restriktionskarte des Stammes V 660 wurde von Menna et al. (19) übernommen und danach orientierten wir mittels Hybridisation unsere Restriktionskarten. Die Aussagekraft der Restriktionskarten ist gegenüber dem alleinigen Restriktionsmuster viel präziser. Auf diese Weise konnten wir bestätigen, dass gleich grosse Fragmente zum Teil auch gleiche Positionen im DNA-Strang innehalten. Zum Beispiel liegt das Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 3.4×10^6 , das bei 7 Stomatitis papulosa Stämmen im Eco RI Muster auftrat, bei allen 5 kartierten Vertretern auf der rechten Seite anschliessend an das Endfragment. Bei den Stämmen M 20/4, 66/1456 und Ch32/H waren die Eco RI-Muster sehr ähnlich, ebenso verhielten sich ihre Karten, ausser beim Stamm Ch32/H, wo die Fragmente A und B ihren Platz getauscht hatten. Das Hind III Fragment von 6,1 bis 6,5 Mio, das sich bei allen Stomatitis papulosa-Virusstämmen fand, lag bei den Stämmen M 20/4, 66/1456 und Ch32/H gleich neben dem linken Endfragment, bei den übrigen Isolaten aber auf der rechten Seite. Bei den beiden Pustulardermatitisstämmen lagen die komigrierenden Eco RI Fragmente A,B,D,G in

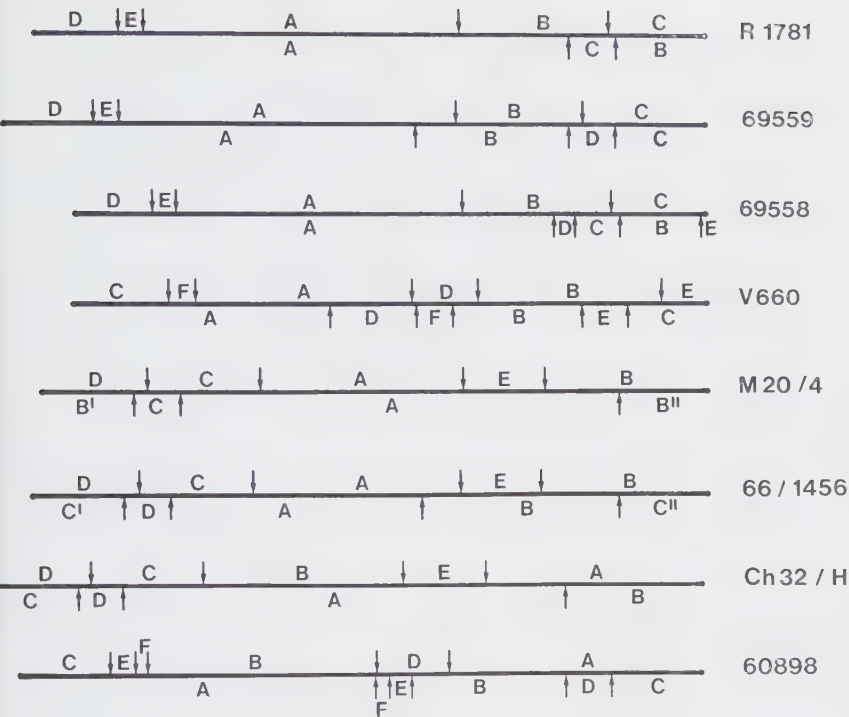
der gleichen Reihenfolge auf den Restriktionskarten. Die beiden Euterpockenviren wiesen bereits in der Restriktionsanalyse unterschiedliche Muster auf. Entsprechend verschieden sind daher auch die Restriktionskarten.

Abb. 4:

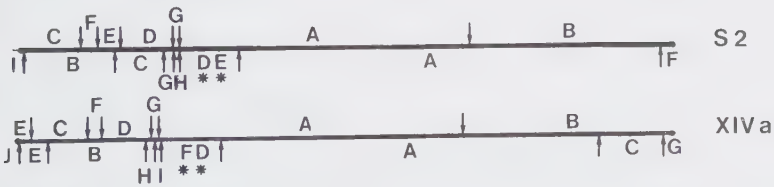
Restriktionskarten der DNA von 12 Parapockenviren für die Endonukleasen Eco RI und Hind III.

Die Pfeile oberhalb der Linie markieren die Eco RI, jene unterhalb die Hind III Erkennungssequenzen. Fragmente, deren Reihenfolge und Lage nicht genau bestimmt wurde, sind mit einem Stern bezeichnet.

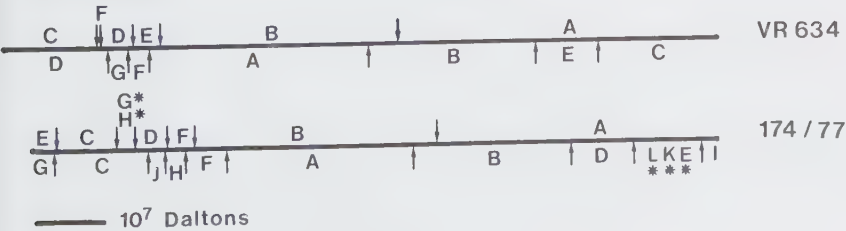
Stomatitis papulosa



Pustuladermatitis



Euterpocken



4.4. Hybridisationsergebnisse

Die Restriktionsanalyse ergab nur punktuelle Informationen über das Vorhandensein oder Fehlen einer kurzen DNA Sequenz, nämlich der Erkennungssequenz des betreffenden Restriktions-enzymes. Bei der Hybridisation von DNA-Fragmenten auf andere DNA-Moleküle hingegen, erfasst man grössere homologe Abschnitte. Man kann daher nachprüfen, ob bestimmte Regionen einer DNA grössere Sequenzhomologien mit Bereichen einer anderen DNA aufweisen. Zur Abklärung verwandtschaftlicher Beziehungen können daher grössere Abschnitte zweier DNA Moleküle miteinander verglichen werden.

Für die Hybridisationsexperimente wurden die folgenden Fragmente radioaktiv markiert:

Stomatitis papulosa-Stämme

R 1781	Eco RI	A,B,C,D,E
Ch 32/H	Hind III	D
60898	Eco RI	C
69558	Eco RI	D

Pustuladermatitis-Stämme

Souche 2	Eco RI	C
	Hind III	A,B,C,D,E,F

Euterpocken-Stämme:

VR 634	Eco RI	C
	Hind III	C
174/77	Eco RI	D,E,H
	Hind III	E,G,J

DNA von jedem Virusisolat wurde mit Eco RI und Hind III verdaut, die Fragmente in Agarose Gelen getrennt und auf Membranen transferiert. Die Membranen wurden anschliessend in parallele Streifen geschnitten und je 2 Streifen eines jeden Virusisolates, welches die Hind III und Eco RI Fragmente enthielten, wurden mit jeweils einem isolierten, radioaktiv markierten Fragment hybridisiert. Es hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, wenn wir alle Hybridisationsexperimente besprochen

und die entsprechenden Autoradiographien aufgeführt hätten. Wir präsentieren deshalb nur jene Ergebnisse ausführlich, welche von besonderem Interesse sind. Die Autoradiographien sollen nur zeigen, auf welche Isolate ein bestimmtes Fragment hybridisierte, erlauben aber nicht, die markierte Bande zu identifizieren. Dazu wurden die Röntgenfilme so lange exponiert, bis die übrigen wegen unspezifischen Reaktionen ebenfalls schwach markierten Banden sichtbar wurden. Dadurch konnten die spezifisch hybridisierten Fragmente identifiziert werden.

In einem ersten Experiment versuchten wir, alle Eco RI Fragmente des Isolates R 1781 auf die Fragmente der anderen Stämme zu hybridisieren. Die Eco RI Fragmente A (Autoradiographie nicht gezeigt), B (Abb. 5) und E (Autoradiographie nicht gezeigt), welche alle im Mittelstück (Abb. 4) des Genoms liegen, hybridisierten mit DNA Fragmenten von allen anderen Parapockenviren. Eine genaue Analyse der Abb. 5 ergab, dass die Hybridisation mit Fragmenten stattfand, welche bei allen Isolaten ebenfalls dem Mittelstück des Genoms entstammten. Diese Region des Genoms scheint also stark konserviert zu sein, wie dies auch bei den Orthopockenviren der Fall ist. Das Ergebnis konnte mit dem markierten Hind III D Fragment des Isolates Souche 2 bestätigt werden (nicht gezeigt).

Durch Hybridisationen mit dem Eco RI E Fragment des Stammes R 1781 (nicht gezeigt), welches an das Eco RI F Fragment des Stammes V 660 hybridisierte und welches auf der Restriktionskarte von Menna (19) auf dem linken Genomabschnitt liegt, konnten alle Restriktionskarten bezüglich links und rechts orientiert werden.

Hybridisation mit den Eco RI Endfragmenten C (Abb. 6) und D (nicht gezeigt) des Stammes R 1781 ergaben bereits erste Differenzierungsmöglichkeiten, denn sie hybridisierten nur noch mit einem Teil der Parapockenisolates. Einerseits mit

allen Stomatitis papulosa Isolaten und andererseits mit den angeblich von Pustuladermatitis Läsionen stammenden Viren Ch 32/H und 60898.

Abb. 6 zeigt, dass auf den Streifen 1 bis 10 eine Hybridisation stattgefunden hat. Zum Teil wurden auch zwei Banden deutlich hybridisiert, wie dies bei den Streifen 1 und 4 der Fall ist, auf dieses Ergebnis wird am Schluss speziell eingegangen.

Zur Bestätigung dieser Resultate wurden Hybridisationen mit dem Eco RI Endfragment D des Stomatitis papulosa Isolates 69558 durchgeführt (Abb. 7). Die Autoradiographie zeigte wiederum das gleiche Resultat. Auch dieses Fragment hybridisierte nur an Isolaten von Stomatitis papulosa Viren (Streifen 1 bis 10). In der Hoffnung, bei den Euterpocken Isolaten ähnliche Verhältnisse nachweisen zu können, führten wir mit dem Hind III Endfragment G des Stammes 174/77 Hybridisationsexperimente durch. Aus Abb. 8 ist wiederum klar ersichtlich, dass das Fragment nur mit den Euterpockenisolaten hybridisierte (Streifen 12 bis 15). Das schon bei den Stomatitis papulosa Endfragmenten angesprochene Phänomen, dass auch die gegenüberliegenden Endfragmente, zwar etwas schwächer, hybridisierten, trat hier deutlich zu Tage. Zur Bestätigung wurde das Experiment mit dem Eco RI Endfragment C des Isolates VR 634 wiederholt (Autoradiographie nicht gezeigt). Weil dieses Fragment viel länger als das Eco RI E Fragment des Isolates 174/77 war, hybridisierte es ebenfalls mit dem angrenzenden Eco RI C Fragment des Isolates 174/77. Daraus war zu schliessen, dass trotz einer zusätzlichen Eco RI und Hind III Schnittstelle in diesem Abschnitt grössere DNA Sequenzhomologien vorkommen als erwartet. Auch am anderen Euterpocken DNA-Moleküle gelangten wir mit den Hybridisationen des Fragmentes VR 634 Hind C zu ähnlichen Ergebnissen. Auch dieses Endfragment hybridisierte nur mit den Euterpocken DNA deutlich.

Abb. 5:

Hybridisationen des (32)P markierten Eco RI B Fragments des Stomatitis papulosa Isolates R 1781 auf membrangebundene Eco RI DNA-Restriktionsfragmente verschiedener Parapocken-isolate.

Streifen 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

(1)V 660, (2)VR 801, (3)69559, (4)R 1374, (5)R 1781,
(6)69559, (7)M 20/4, (8)66/1456, (9)Ch 32/H, (10)60898

Streifen 11 u. 12: Pustuladermatitis-Stämme

(11)Souche 2, (12)XIVa

Streifen 13 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634, (14)P4/4, (15)174/77



HYBRIDISIERTE
FRAGMENTE:

B B B B B B B A A B B A A

Abb. 6:

Hybridisation des ^{32}P markierten Eco RI C Fragments des Stomatitis papulosa Isolates R 1781 auf membrangebundene Eco RI DNA Restriktionsfragmente verschiedener Parapocken-isolate.

Streifen 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

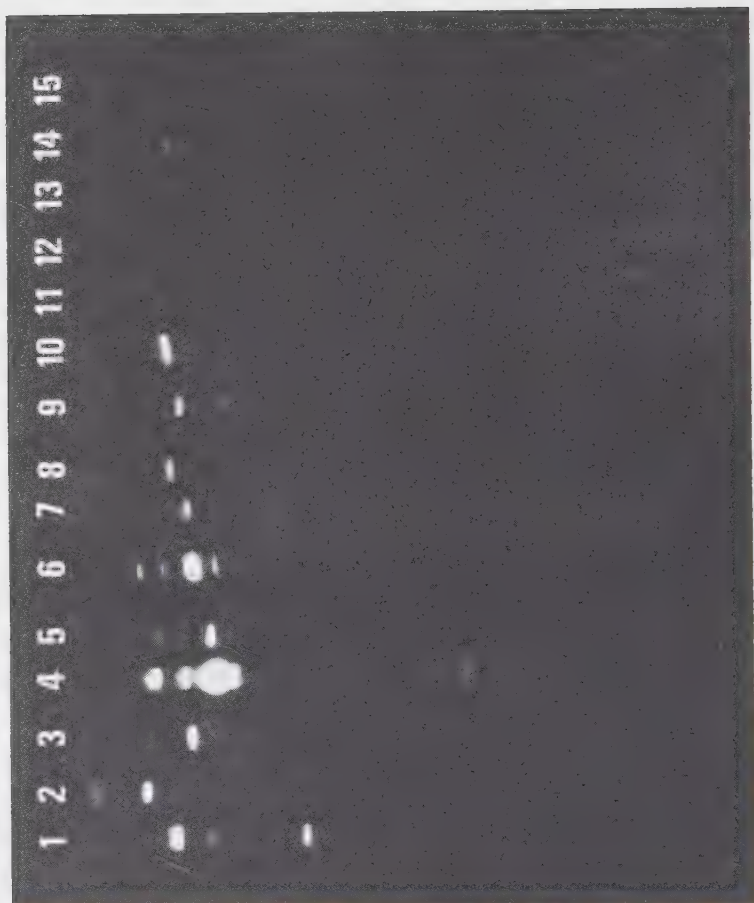
(1)V 660, (2)VR 801, (3)69559, (4)R 1374, (5)R 1781,
(6)69558, (7)M 20/4, (8)66/1456, (9)Ch 32/H, (10)60898

Streifen 11 u. 12: Pustuladermatitis-Stämme

(11)Souche 2, (12)XIVa

Streifen 13 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634, (14)P4/4, (15)174/77



HYBRIDISIERTE
FRAGMENTE:

B B C C C C B B A A
E

Abb. 7:

Hybridisation des ^{32}P markierten Eco RI D Fragments des Stomatitis papulosa-Isolates 69558 auf membrangebundene Eco RI DNA Restriktionsfragmente verschiedener Parapocken-isolate.

Streifen 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

(1)V 660, (2)VR 801, (3)69559, (4)R 1374, (5)R 1781,
(6)69558, (7)M 20/4, (8)66/1456, (9)Ch 32/H, (10)60898

Streifen 11 u. 12: Pustuladermatitis-Stämme

(11)Souche 2, (12)XIVa

Streifen 13 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634, (14)P4/4, (15)174/77



HYBRIDISIERTE
FRAGMENTE:

C C D D D D D D C

Abb. 8:

Hybridisation des ^{32}P markierten Hind III Fragmentes G des Euterpocken Isolates 174/77 auf membrangebundene Eco RI DNA Restriktionsfragmente verschiedener Parapockenvirus Isolate.

Streifen 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

(1)V 660, (2)VR 801, (3)69559, (4)R 1374, (5)R 1781,
(6)69558, (7)M 20/4, (8)66/1456, (9)Ch 32/H, (10)60898

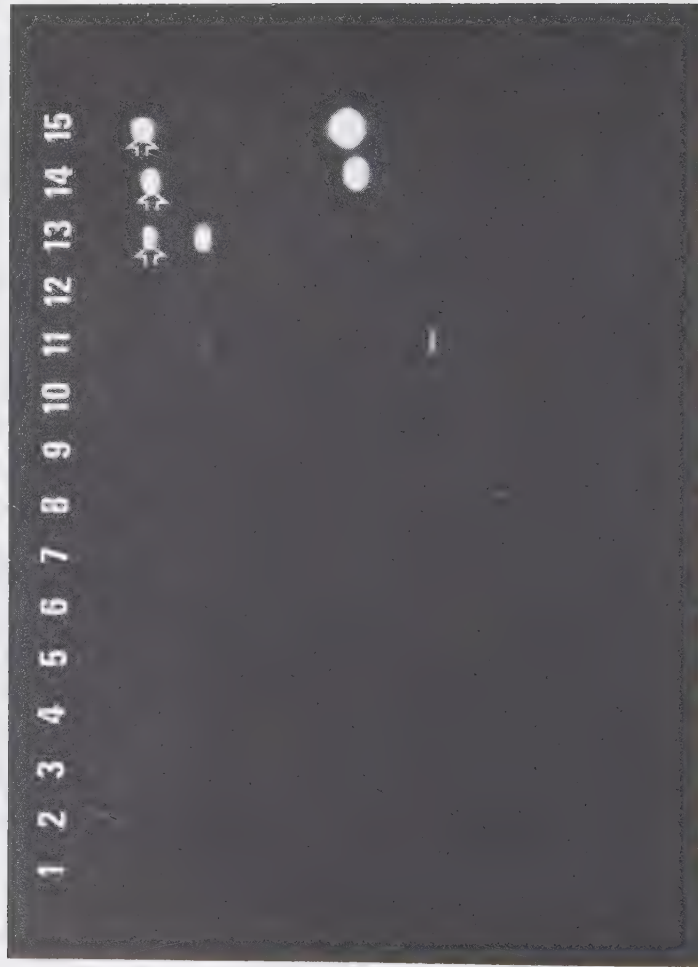
Streifen 11 u. 12: Pustulardermatitis-Stämme

(11)Souche 2, (12)XIVa

Streifen 12 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634, (14)P4/4, (15)174/77

Die mit einem Pfeil markierten Banden sind kreuzhybridisierte Endfragmente.



HYBRIDISIERTE
FRAGMENTE:

C E E

Von besonderem Interesse war nun das Verhalten der Endfragmente der beiden Pustulardermatitis Isolate Souche 2 und XIVA (Autoradiographien nicht gezeigt). Das Hind III F Fragment des Isolates Souche 2 hybridisierte nur mit dem ebenfalls rechten Endfragment Hind III G des Isolates XIVA. Das linke Endfragment Eco RI C des Isolates Souche 2 hybridisierte nur mit dem Eco RI Fragment E. Dies könnte damit erklärt werden, dass das Isolat Souche 2 ein durch Deletionen verkürztes linkes Genomende besitzt, wobei das Eco RI C Fragment zum neuen Endfragment geworden ist.

Die Hybridisation mit dem Eco RI D Fragment des Euterpockenisolates 174/77 brachte ein unerwartetes Ergebnis. Dieses Fragment liegt im Grenzbereich zwischen der konservativen Zentralregion und dem den Euterpocken eigenen Endbereich und hybridisierte wie erwartet mit DNA Fragmenten aller Euterpocken Isolate, aber auch mit den zwei Pustulardermatitis Isolaten Souche 2 und XIVA (Autoradiographie nicht gezeigt). Das Experiment wurde daher mit dem etwas kleineren Hind III J Fragment wiederholt (Abb. 9). Wiederum wurde eine deutliche Hybridisation nicht nur mit den beiden Euterpockenisolaten, sondern auch mit den beiden Pustulardermatitis Isolaten gefunden (Abb. 9, Bahn 11 und 12). Dieser Genombereich der Euterpocken Isolate besitzt also grössere Sequenzhomologien mit entsprechenden Bereichen der Pustulardermatitis Isolate. Die beiden uns als Pustulardermatitis-Isolate zur Verfügung gestellten Virusstämme Ch 32/H und 60898 verhielten sich in allen Hybridisationsexperimenten wie Isolate von Stomatitis papulosa Viren. Die Umteilung schien uns daher gerechtfertigt zu sein. Für die Präsentation der vorangehenden Abbildungen und Tabellen wurde diese Neuzuteilung aus Gründen der Uebersichtlichkeit bereits vorgenommen.

Die Ergebnisse aller Hybridisationsversuche, bei denen isolierte, radioaktiv markierte Fragmente an die DNA der verschiedenen Parapocken isolate hybridisiert wurden, sind schematisch in Abb. 11 zusammengefasst.

Abb. 9:

Hybridisation des ^{32}P markierten Hind III Fragmentes J des Euterpocken Isolates 174/77 auf Membran gebundene Eco RI DNA Restriktionsfragmente verschiedener Parapocken Isolate.

Streifen 1 - 10: Stomatitis papulosa-Stämme

(1)V 660, (2)VR 801, (3)69559, (4)R 1374, (5)R 1781,
(6)69558, (7)M 20/4, (8)66/1456, (9)Ch 32/H, (10)60898

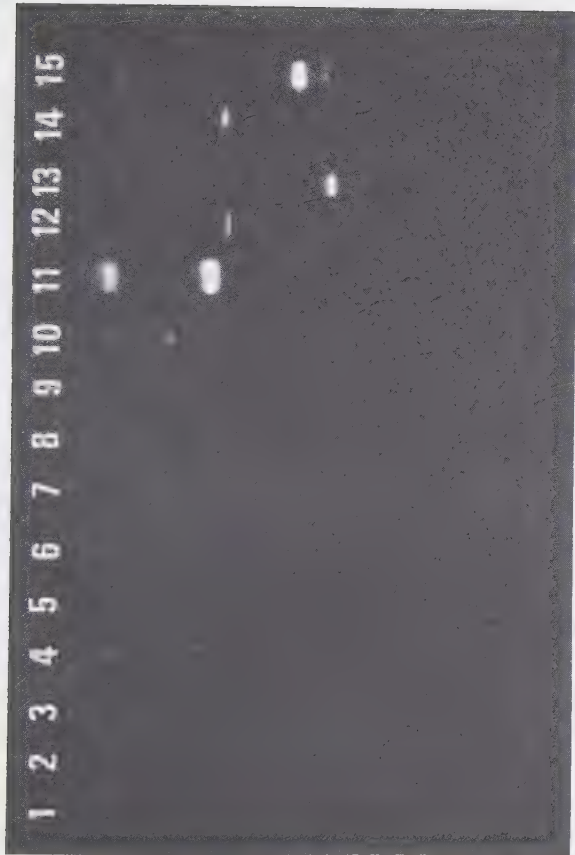
Streifen 11 u. 12: Pustulardermatitis-Stämme

(11)Souche 2, (12)XIVa

Streifen 13 - 15: Euterpocken-Stämme

(13)VR 634, (14)P4/4, (15)174/77

Die Abklärung, welches der nahe beisammenliegenden Fragmente hybridisiert wurde, war nicht möglich, da wir von diesem Stamm keine Restriktionskarte erstellt hatten.



HYBRIDISIERTE
FRAGMENTE:

D D D C/D D

4.5. Kreuzhybridisationen der Endbereiche

Bei den Hybridisationsexperimenten mit den isolierten Endfragmenten ist aufgefallen, dass das jeweils gegenüberliegende Endfragment ebenfalls mehr oder weniger hybridisierte. Dieses Phänomen wurde mit dem Pustuladermatitis Isolat Souche 2 durch folgendes Experiment näher untersucht:

Die radioaktiv markierten Hind III Fragmente A,B,C,D,E,F,G wurden auf die mit Hind III verdaute DNA des gleichen Isolates, welches auf Membranen transferiert worden war, hybridisiert (Abb. 10). Erwartungsgemäss hätte nun jedes markierte Fragment an das gleiche Fragment auf der Membran hybridisieren müssen. Dies war für die meisten Fragmente auch der Fall. Ausnahmen machten dabei aber das Fragment B, welches nicht nur an F, sondern auch an B hybridisierte. Das Fragment F ist ein Endfragment, B dagegen liegt in unmittelbarer Nähe des Endes. Die Endbereiche müssen also identische Basensequenzen enthalten. Dies wurde schon von Menna et al. (19) erwähnt, und hat sich bei allen von uns untersuchten Parapockenstämmen ebenfalls gezeigt.

Abb. 10:

Hybridisation der ^{32}P markierten Hind III Fragmente A - G
des Pustulardermatitis-Isolates Souche 2 auf membrange-
bundene Souche 2 Hind III Restriktionsfragmente.

Streifen: (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7)

Fragment: A B C D E F G

Kreuzhybridisierte Fragmente: Streifen 2: F; Streifen 6: B

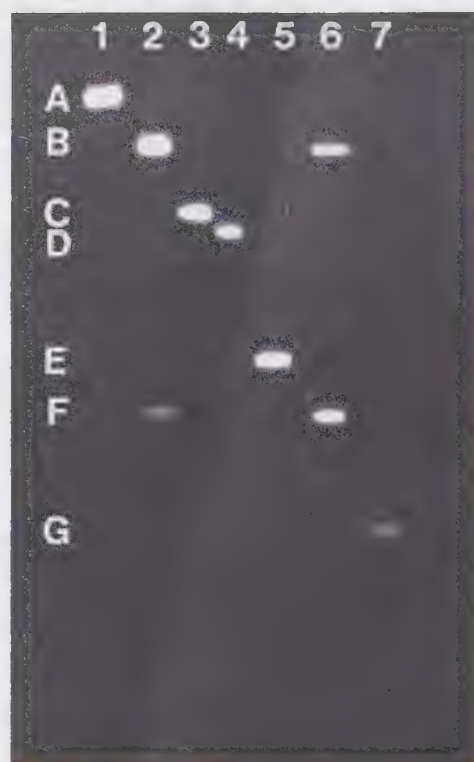
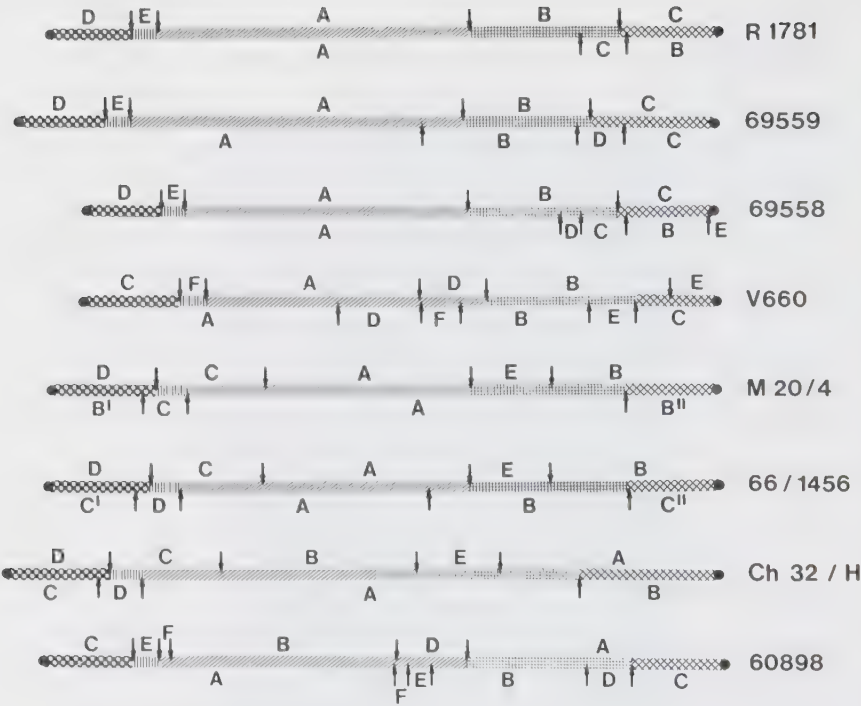


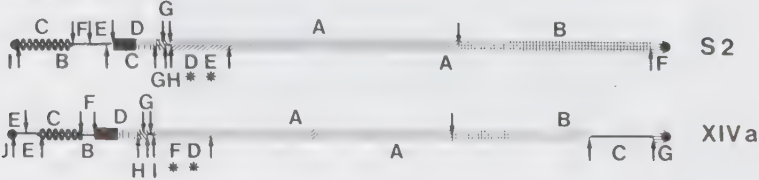
Abb. 11:

Bereiche mit grosser DNA Sequenzhomologie der verschiedenen Parapockenvirus Isolate. Genomabschnitte, welche zwischen verschiedenen Isolaten hybridisierten, sind mit der gleichen Schraffur gekennzeichnet worden. Dünne Linien (nicht schraffiert) bedeuten, dass für diesen Abschnitt keine Aussage gemacht werden kann. Die mit * bezeichneten Fragmente wurden nicht genau lokalisiert, ihre angegebene Reihenfolge ist willkürlich.

Stomatitis papulosa



Pustulardermatitis



Euterpocken



— 10⁷ Daltons

5. DISKUSSION

Stomatitis papulosa-, Pustulardermatitis- und Euterpockenviren lassen sich mit klassischen virologischen, aber auch mit immunologischen Methoden (14,15,16,26) nicht unterscheiden. Raymann (27) und Wittek et al. (37) haben daher versucht, Parapockenviren mit Hilfe der Restriktionsanalyse zu differenzieren. Dabei wurde eine grosse genetische Heterogenität zwischen einzelnen Isolaten festgestellt.

Bei den von uns untersuchten Isolaten konnten diese Befunde bestätigt werden. Einzelne Vertreter der Stomatitis papulosa Viren konnten zwar zu Gruppen mit ähnlichen Fragmentmustern zusammengefasst werden, wie dies bereits von Raymann (27) und Wittek et al. (37) beschrieben worden war, Vertreter verschiedener Gruppen besaßen in ihren Mustern jedoch praktisch keine Gemeinsamkeiten mehr. Die beiden Pustulardermatitis Isolate erwiesen sich in der Restriktionsanalyse zwar als sehr ähnlich, doch kann bei nur zwei untersuchten Isolaten nicht auf eine grössere Homogenität unter Vertretern dieses Subgenus geschlossen werden. Robinson et al. (29), der eine grössere Anzahl von Feldisolaten von Pustulardermatitis Viren mit der Restriktionsanalyse untersucht hat, stellte bei diesen Isolaten ebenfalls eine grosse Heterogenität fest. Die drei von uns untersuchten Euterpockenviren schliesslich wiesen ebenfalls eine recht grosse Variabilität in den Restriktionsmustern auf.

Diese mit der Restriktionsanalyse festgestellte genetische Heterogenität steht im Gegensatz zu der mit serologischen Methoden festgestellten scheinbaren Homogenität der ganzen Parapockenvirus-Gruppe. Dieser Gegensatz überrascht aber nicht, wenn man sich bewusst ist, dass die beiden Untersuchungsmethoden nach grundsätzlich verschiedenen Prinzipien arbeiten. Für serologische Kreuzreaktionen kann eine kleine

Anzahl gemeinsamer Antigene, im Extremfall ein einziges, "gruppenspezifisches" Antigen verantwortlich sein. Für die Kodierung dieses Antigens genügt theoretisch ein kleiner Abschnitt von ungefähr 1000 Basenpaaren auf dem DNA Molekül. Falls dieses Antigen in der Immunreaktion des Wirtes aber eine entscheidende Rolle spielt, können zwei Viren, welche nur in einem sehr kleinen Genomabschnitt DNA Sequenzhomologien aufweisen müssen, mit serologischen Methoden als verwandt erscheinen.

Die Restriktionsanalyse hingegen entnimmt punktförmlich Stichproben aus dem Gesamtgenom, ohne jedoch nach der biologischen Relevanz dieser DNA Sequenzen zu fragen. Mit Restriktionsanalyse festgestellte genetische Heterogenität einerseits und mit serologischen Methoden festgestellte Homogenität einer Virusgruppe andererseits, müssen also nicht unbedingt ein Widerspruch sein.

Mit ihrer grossen Variabilität in den Restriktionsmustern unterscheiden sich die Parapockenviren stark von den Orthopockenviren, welche in der Restriktionsanalyse als viel homogener erscheinen. Bei den Orthopockenviren treten in der Restriktionsanalyse immer eine grössere Anzahl komigrierender Fragmente zwischen verschiedenen Vertretern auf (8,5,20), was auf einen stark konservierten mittleren Genombereich zurückzuführen ist (17,34). Damit kann ein Orthopockenvirus allein schon aufgrund seines Restriktionsmusters leicht als solches identifiziert werden. Andererseits erlauben aber charakteristische Unterschiede eine klare Abgrenzung verschiedener Vertreter.

Eine gewisse Anzahl komigrierender Fragmente ist Voraussetzung, um zwei Genome in der Restriktionsanalyse als verwandt erscheinen zu lassen. Diese Zahl lässt sich jedoch nicht genau festlegen und bleibt weitgehend eine Ermessensfrage. Komigrieren aber zum Beispiel die Hälfte der Restriktionsfragmente zweier Virusgenome, wird man diese ohne Schwierig-

keiten als verwandt bezeichnen. Zudem können verschiedene Restriktionsenzyme verwendet werden, um diese Aussage zu bestätigen. Unterschreitet aber die Anzahl komigrierender Fragmente ein gewisses, ebenfalls nicht genau festlegbares Minimalmass, wird es nicht mehr möglich sein, zu beurteilen, ob die beiden Genome noch verwandt sind, oder ob die komigrierenden Fragmente reine Zufallsprodukte und nicht auf Sequenzhomologien in bestimmten Genombereichen zurückzuführen sind.

Restriktionskarten erlauben viel präzisere Aussagen über die Homologien bestimmter Genomabschnitte (17,34,35). So könnte man rein aufgrund des Restriktionsmusters versucht sein, ein Hind III Fragment mit einem Molekulargewicht zwischen 1.6 und 6.5×10^6 , das bei allen untersuchten Stomatitis papulosa Isolaten vorkommt, als Ausdruck einer grossen DNA Sequenzhomologie in einem bestimmten Genomabschnitt zu sehen. Die Kartographie der Restriktionsstellen, die dieses Fragment auf den verschiedenen Genomen lokalisiert, zeigt aber, dass dies nur bedingt stimmt. Bei 5 Isolaten liegt dieses Fragment auf der rechten Seite, bei den anderen drei Vertretern aber auf der linken Genomhälfte.

Die Restriktionsanalyse setzt eine grosse DNA Sequenzhomologie zweier DNA Moleküle voraus, um ein ideales Verhältnis von komigrierenden und nicht komigrierenden Fragmenten zu ergeben. Schümperli et al. (30) haben berechnet, dass bei weniger als 80% DNA Sequenzhomologie zwischen zwei DNAs keine komigrierende Fragmente zu erwarten sind. Daher lässt sich bei zwei DNAs, zwischen denen in der Restriktionsanalyse keine komigrierenden Fragmente auftreten, nicht sagen, ob diese überhaupt keine DNA Sequenzhomologien mehr aufweisen, oder ob nun jene kritische Schwelle unterschritten worden ist, die für ihren Nachweis in der Restriktionsanalyse notwendig ist.

Bei den Parapockenviren, bei denen eine grosse Variabilität in den Restriktionsmustern verschiedener Isolate auftritt, scheinen die DNA Sequenzhomologien nicht mehr auszureichen, um eine notwendige Anzahl komigrierender Fragmente zu ergeben. Die Restriktionsanalyse scheint bei den Parapockenviren an die Grenze ihrer Möglichkeiten zu stossen, denn ein neues, unbekanntes Isolat mit einem vollständig neuen Muster hätte weder als Parapockenvirus klassifiziert, noch als Stomatitis papulosa-, Pustuladermatitis- oder Euterpockenvirus identifiziert werden können.

Wir hofften daher, mit DNA-DNA Hybridisation, die grössere Genombereiche miteinander vergleichen lässt und weniger DNA Sequenzhomologie voraussetzt, mehr Ähnlichkeiten unter den verschiedenen Parapockenisolaten festzustellen. Dabei wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass bei Parapockenviren, ähnlich wie bei Orthopockenviren, die DNA Sequenzen bei verschiedenen Vertretern im mittleren Genombereich stärker konserviert sind als DNA Sequenzen an den Enden.

Die Hybridisationen bestätigten diese Hypothese, denn DNA Fragmente aus einem mittleren Genombereich eines Isolates hybridisierten mit entsprechenden Genomabschnitten aller Isolate. Entsprechende Hybridisationen erlauben also, ein neues Parapockenvirus Isolat eindeutig als solches zu identifizieren.

Wiederum in Analogie zu den Orthopockenviren vermuteten wir, dass die Enden der Parapockenvirusgenome stark divergierende DNA Sequenzen aufweisen würden, was für die Differenzierung ausgenutzt werden könnte. Hybridisierungen mit isolierten Endfragmenten bestätigten diese Vermutung. Endfragmente der DNA von Stomatitis papulosa-Viren hybridisierten nur noch mit anderen Isolaten von Stomatitis papulosa-Viren. Endfragmente von Pustuladermatitis-Viren nur noch mit anderen Pustuladermatitis Isolaten und jene von Euterpockenviren nur

noch mit Euterpocken Isolaten. Damit kann ein neues Parapocken Isolat eindeutig klassifiziert werden. Dies ermöglicht nun, die Parapockenviren innerhalb der Familie der Pockenviren nach folgendem System zu klassifizieren:

Familie:	Poxviridae
Subfamilie:	Chordopoxviridase
Genus:	Parapoxvirus
Subgenus:	Stomatitis papulosa Euterpocken Pustulardermatitis

Parapockenviren unterscheiden sich damit, was die Aufgliederung ihres Genomes im Bereiche mit mehr oder weniger grosser DNA Sequenzhomologie anbelangt, nur unwesentlich von Orthopockenviren. Die DNA Sequenzhomologie bei Parapockenviren ist aber weniger ausgeprägt und kann im Gegensatz zu den Orthopockenviren nicht mehr mit der Restriktionsanalyse erfasst werden.

Interessanterweise hybridisierte ein Restriktionsfragment der DNA eines Euterpocken Isolates, welches im Bereich zwischen der konservierten Zentralregion und dem den verschiedenen Subgenera eigenen Endbereich liegt, nicht nur mit Vertretern anderer Euterpocken, sondern auch mit der DNA der beiden Pustulardermatitis Isolate. Daraus könnte man schliessen, dass die Euterpockenviren näher mit den Pustulardermatitis Viren verwandt sind, als mit den Stomatitis papulosa Viren, was nicht leicht zu verstehen ist. Um diese Frage weiter abzuklären, müsste dieser Genombereich mit feineren Analysemethoden, zum Beispiel mit Schmelzkurven der Hybride, näher untersucht werden. Es müssten aber auch mehr vergleichende Grundlagen zur Biologie der Parapockenviren erarbeitet werden.

Die Umteilung der beiden uns zur Verfügung gestellten Pustulardermatitis Isolate (Isolat Ch 32/H und 60898) zu den Stomatitis papulosa Viren scheint uns nach diesen Untersuchungen gerechtfertigt. Beide Vertreter verhielten sich

sowohl in der Restriktionsanalyse als auch in den Hybridisationen eindeutig als Vertreter der Stomatitis papulosa Viren. Da bekannt ist, dass Stomatitis papulosa Viren auf Schafe und Pustuladermatitis Viren auf Rinder übertragen werden können, überrascht es nicht, dass aus gemischten Schaf- und Rinderbeständen gelegentlich Pustuladermatitis Viren beim Rind, oder Stomatitis papulosa Viren beim Schaf isoliert werden.

Die Klassifikation der Parapockenviren mit Hybridisation scheint eine etwas aufwendige Methode zu sein, liesse sich aber durch bestimmte Vorarbeiten wesentlich vereinfachen. Fragmente aus der gewünschten Region der Genome gut charakterisierter Isolate könnten in bakteriellen Plasmiden kloniert und damit in grosser Menge und Reinheit produziert werden. Die DNA eines Isolates müsste dann nur noch mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten, die DNA Fragmente getrennt und auf Membranen transferiert, und schliesslich mit den klonierten Fragmenten hybridisiert werden. Diese Arbeiten liessen sich in kurzer Zeit durchführen.

Wir glauben, dass mit der vorliegenden Arbeit eine Möglichkeit gezeigt wird, wie Isolate von Parapockenviren identifiziert und klassifiziert werden können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

15 Isolate von Parapockenviren wurden Plaque gereinigt und ihre DNA mit Hilfe der Restriktionsanalyse untersucht. Die Molekulargewichte der Virus DNAs variierten zwischen 85 und 97 Millionen, was in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren steht. Die meisten Isolate wiesen stark voneinander abweichende DNA Fragmentmuster auf, was eine grosse genetische Heterogenität innerhalb dieser Virusgruppe vermuten liess und eine Differenzierung der Isolate in Stomatitis papulosa-, Pustulardermatitis-, oder Euterpockenviren vorerst verunmöglichte.

Von 12 Isolaten wurden Restriktionskarten erstellt und die DNA von bestimmten Genomsegmenten einzelner Isolate an die DNA der anderen Isolate hybridisiert. Dabei zeigte sich, dass bei allen untersuchten Parapockenviren stark konservierte DNA Sequenzen in einem mittleren Bereich ihres Genomes gemeinsam vorkommen, die Sequenzen an den Enden aber stark divergierten. In diesem Genombereich trat Hybridisation nur noch zwischen Virusisolaten des gleichen Krankheitsbildes auf.

Mit Hybridisationen können deshalb Isolate als Parapockenviren sowohl eindeutig identifiziert als auch innerhalb des Genus Parapoxvirus in die drei Subgenera Stomatitis papulosa, Euterpocken und Pustulardermatitis klassifiziert werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aynaud: La stomatite pustuleuse contagieuse des ovins.
Ann.Inst.Pasteur 37, 498-527 (1923).
2. Beer, J.: Infektionskrankheiten der Haustiere, Bd.I:
Viruskrankheiten, Chlamydien-Infektionen, Rickettsiosen,
Mykoplasmen (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1974).
3. Berns, K.I. and Silverman, C.: Natural occurrence of
cross-linked vaccinia deoxyribonucleic acid.
J.Virol. 5, 299-304 (1970).
4. Denhardt, A.T.: A membrane filter technique for the de-
tection of complementary DNA.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 23, 641-646 (1966).
5. Esposito, J.J., Obijeski, J.F. and Nakano, J.H.: Ortho-
poxvirus DNA: Strain differentiation by electrophoresis
of restriction endonuclease fragmented virion DNA.
Virology 89, 53-66 (1978).
6. De Filippes, F.M.: Restriction enzyme digests of rapidly
renaturing fragments of vaccinia virus DNA.
J.Virol. 17, 227-238 (1976).
7. Frerichs, G.N.: Studies on orf virus infection in sheep.
PhD Thesis, London University, Vet.Lab, Weybridge, Surrey,
UK. (1980).
8. Gangemi, J.D. and Sharp, D.G.: Use of a restriction endo-
nuclease in analyzing the genomes from two different
strains of vaccinia virus.
J.Virol. 20, 319-323 (1976).
9. Geshelin, P. and Berns, K.I.: Characterization and loca-
lization of the naturally occurring cross-links in vaccinia
virus DNA.
J.Mol.Biol. 88, 785-796 (1974).
10. Goldsmit, L. and Barzilai, E.: Propagation of bovine
viral diarrhoea viruses in bovine fetal lung cultures.
Am.J.Vet.Res. 36, 407-412 (1975).
11. Huck, R.A.: A Paravaccinia Virus isolated from Cow's
Teat's.
Vet.Res. 78, 503-505 (1966).

12. Joklik, W.K.: The purification of four strains of pox-virus.
Virology 18, 9-18 (1962).
13. Knothe, H. und Witt, G.: Zur Aetiologie des Melkerknotens.
Arch.Hyg.Bakt. 151, 186-189 (1967).
14. Lauder, J.M., Martin, B., Martin, W.G., Nagington, J.:
Milker's Nodule Virus Infection and its Resemblance to
Orf.
Vet.Rec. 78, 926 (1966).
15. Liebermann, H.: Beziehungen zwischen Melkerknoten, Euter-
pocken, Stomatitis papulosa und Ecthyma contagiosum.
Zschr.ärztl.Fortbild. 61, 447-448 (1967).
16. Liebermann, H.: Vergl. immunhistol. Studien an mit Para-
vakzineviren infizierten Zellkulturen.
Arch.exp.Vet.Med. 21, 1379-1389 (1967).
17. Mackett, M. and Archard, L.C.: Conservation and Variation
in Orthopoxvirus Genome Structure.
J.Gen.Virol. 45, 683-701 (1979).
18. Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. and Wittmann, G.:
Virologische Arbeitsmethoden, Bd. 1: Zellkulturen, Be-
brütete Hühnereier, Versuchstiere (VEB Gustav Fischer
Verlag, Jena 1974).
19. Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P.A., Mayr, A. and Wyler,
R.: Physical characterization of a stomatitis papulosa
virus genome: A cleavage map for the restriction endonu-
cleases Hind III and Eco RI.
Arch.Virol. 59, 145-156 (1979).
20. Müller, H.K., Wittek, R., Schaffner, W., Schümperli, D.,
Menna, A. and Wyler, R.: Comparison of five poxvirus ge-
nomes by analysis with restriction endonucleases Hind III,
Bam I and Eco RI.
J.Gen.Virol. 38, 135-147 (1977).
21. Nagington, J., Tee, G.H., Smith, J.S.: Milker's Nodule
Virus infection in Dorset and their similarity to Orf.
Vet.Rec. 78, 305-308 (1966).
22. Nagington, J., Lauder, J.M. and Smith, J.S.: Bovine papu-
lar stomatitis, pseudocowpox and milker's nodules.
Vet.Rec. 81, 307-313 (1967).

23. Nagington, J.: The growth of paravaccinia viruses in tissue culture.
Vet.Rec. 82, 477-482 (1968).
24. Von Pirquet, Cl.: Die Paravaccine.
Zschr.Kinderheilk. 13, 309-331 (1915)
25. Plowright, W. and Ferris, R.D.: Papular Stomatitis of Cattle in Kenya and Nigeria.
Vet.Rec. 71, 718-723 (1959).
26. Pospischil, A. and Bachmann, P.A.: Nuclear Changes in Cells Infected with Parapoxviruses Stomatitis papulosa and Orf: an in vivo and in vitro Ultrastructural Study.
J.Gen.Virol. 47, 113-121 (1980).
27. Raymann, K.: Klassifizierung der Parapoxviren mit Hilfe der Restriktionsanalyse. Diss. Universität Zürich, Vet. Med. Fakultät (1980).
28. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: Labeling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J.Mol.Biol. 113, 237-251 (1977).
29. Robinson, A.J., Ellis, G. and Balassu, T.: The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep.
Arch.Virol. 71, 43-55 (1982).
30. Schümperli, D., Lagadec, R. and Müller, H.K.: DNA sequence homology estimation by combinatorial analysis of endonuclease restriction data.
J.Gen.Virol. 38, 161-166 (1978).
31. Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J.Mol.Biol. 98, 503-518 (1975).
32. Thomas, V., Flores, L., and Holowczak, J.A.: Biochemical and electron microscopic studies of the replication and composition of milker's node virus.
J.Virol. 34,
33. Vogelstein, B. and Gillespie, D.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 76, 615-619 (1979).

34. Wittek, R., Menna, A., Schümperli, D., Stoffel, S., Müller, H.K. and Wyler, R.: Hind III and Sst I restriction sites mapped on rabbit poxvirus and vaccinia virus DNA.
J.Virol. 23, 669-678 (1977).
35. Wittek, R., Menna, A., Schümperli, D., Boseley, P.G. and Wyler, R.: Inverted terminal repeats in rabbit poxvirus and vaccinia virus DNA.
J.Virol. 28, 171-181 (1978).
36. Wittek, R., Kuenzle, C.C. and Wyler, R.: High C + G content in Parapoxvirus DNA.
J.Gen.Virol. 43, 231-234 (1979).
37. Wittek, R., Herlyn, M., Schümperli, D., Bachmann, P.A., Mayr, A. and Wyler, R.: Genetic and Antigenic Heterogeneity of Different Parapoxvirus Strains.
Intervirology 13, 33-41 (1980).

VERDANKUNGEN

Herzlich danken möchte ich all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich:

Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas und die Leitung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Wittek für das Korreferat und die Ueberarbeitung des Manuskriptes.

Herrn Dr. K. Raymann für die zur Verfügung gestellten Parapockenvirusstämme.

Herrn Beat Scheier für die zuverlässige technische Mitarbeit.

Frl. Ch. Gerber für die Reinschrift der Manuskripte.

Frau A. Hug und Frau S. Pletscher für die Unterstützung bei den graphischen Arbeiten.

LEBENS LAUF

Gassmann Urs, geboren am 11. März 1953 in Luzern

- 1960 - 1968 Besuch der Primar- und Sekundarschule in Sempach
- 1968 - 1970 Kantonsschule Luzern
- 1970 - 1973 Kantonsschule Reussbühl, Matura Typus C
- 1973 - 1979 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
- 1979 - 1980 Verschiedene Assistentenstellen in der Gross- und Kleintierpraxis
- 1980 - 1982 Assistent am Institut für Virologie der Universität Zürich

